

کلونینگ و افزایش بیان موقت ژن NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی به واسطه سیستم بیانی آدنوویروسی بر مبنای فناوری Gateway*

محمد محمدزاده^۱؛ مهریار حبیبی رودکنار^{۲*}

چکیده

زمینه: افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پیوند، کارایی این سلول‌ها را در درمان افزایش می‌دهد. به همین دلیل، دست‌کاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ژن‌های محافظت‌کننده سلولی همانند NF-E2 Related Factor-2 (NRF2) جهت بهبود کارایی سلول درمانی مهم است. هدف این مطالعه، کلونینگ و افزایش بیان موقت ژن NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط سیستم بیانی آدنوویروسی می‌باشد.

روش‌ها: ژن NRF2 از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا و توسط واکنش توپوکلونینگ، به وکتور pENTR/TOPO/D کلون گردید. سپس با استفاده از فناوری Gateway، ژن NRF2 از وکتور pENTR/TOPO/D به وکتور آدنوویروسی منتقل شد. جهت تولید ذرات آدنوویروسی، وکتور آدنوویروسی نوترکیب به سلول‌های 293A منتقل گردید. در مرحله بعد، آدنوویروس‌های نوترکیب محتوی ژن NRF2، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را آلوده کردند.

یافته‌ها: ژن NRF2 با موفقیت جداسازی و کلون شد و صحت توالی آن توسط توالی یابی (DNA) Deoxyribonucleic acid تأیید گردید. افزایش بیان NRF2 مورد ارزیابی قرار گرفت. این افزایش بیان توسط سیستم بیانی آدنوویروس، موقت بود.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان ژن NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط سیستم بیانی آدنوویروس به دلیل بیان موقت آن، یک وسیله بسیار با ارزش می‌باشد. افزایش بیان دائمی ژن‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مجاز نمی‌باشد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، NRF2، مهندسی ژنتیک، وکتورهای ژنتیکی و وکتور کلونینگ

«دریافت: ۱۳۹۱/۸/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۱۰»

۱. گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد

۲. مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون

* عهده‌دار مکاتبات: تهران، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تلفن: ۰۲۱-۸۸۶۰۱۵۹۹

Email: roudkenar@ibto.ir

* این مقاله منتج از پایان نامه دانشجویی آقای محمد محمدزاده جهت اخذ درجه دکترای تخصصی هماتولوژی و بانک خون از مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران می‌باشد.

مقدمه

به دست آورده‌اند. پیوند سلول‌های بنیادی، راه‌کار مناسبی برای درمان بسیاری از بیماری‌های بدخیم مانند انواع لوسمی‌ها و بیماری‌های ژنتیکی و مادرزادی به‌شمار می‌رود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توانایی تمایز به رده‌های مختلف، توانایی فرار از سیستم ایمنی میزبان، خاصیت تعدیل ایمنی و سهولت تکثیر آن‌ها در محیط کشت، سلول‌های ایده‌آلی برای استفاده در سلول درمانی هستند. به‌طوری‌که امروزه پیوند سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (mesenchymal stem cells) یا MSCs) گروهی از سلول‌های کلونی‌زا و پرتوان هستند که می‌توانند به رده‌های مختلفی از جمله استخوانی، چربی، آستروسیتی، عصبی، عضله قلبی، عضله اسکلتی و سایر انواع سلولی تمایز یابند (۱-۴). امروزه به دلیل جداسازی آسان و توانایی تمایز گسترده‌ای که سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارند، کاربردهای مختلفی در پزشکی

نقش مهمی در حفاظت علیه استرس‌های اُکسایشی، آسیب سلولی ناشی از مواد شیمیایی، پیشگیری از سرطان و ترمیم زخم دارد (۹-۱۳).

از آنجایی که بیان دائمی ژن‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مجاز نیست؛ در این تحقیق سلول‌ها با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، به صورت موقت دست‌ورزی شدند. برای این منظور از وکتور آدنوویروس به منظور انتقال ژن NRF2 به سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده گردید. از جمله دلایل انتخاب این وکتور و مزایا استفاده از آن شامل بیان بالا و موقت، آلوده‌سازی تعداد زیادی از سلول‌ها و تغییرات پس از ترجمه‌ای مناسب هستند (۱۴). همچنین این وکتور خارج کروموزومی بوده و تغییری در ساختار کروموزوم‌ها و ژن‌های میزبان ایجاد نمی‌کند.

فناوری Gateway یک روش همسانه‌سازی عمومی بر اساس ویژگی‌های نوترکیبی در جایگاه اختصاصی باکتریوفاژ لامبدا (۸) است (۱۵). این فناوری یک روش سریع و کارآمد برای انتقال توالی‌های Deoxyribonucleic acid (DNA) بین وکتورهای مختلف می‌باشد. در این مطالعه سعی شد که با استفاده از فناوری Gateway ژن NRF2 به وکتور آدنوویروسی منتقل و در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان گردد. همچنین افزایش بیان NRF2 در این سلول‌ها و نیز موقتی بودن آن‌ها ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود و طی مراحل ذیل انجام شد:

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از خون مغز استخوان

به منظور جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نمونه مغز استخوان، پس از کسب رضایت از صاحب آن، به آرامی با محلول فایکول هاپیک (Ficoll/Hypaque) (STEMCELL Technologies) مخلوط گردید. پس از سانتریفوژ شیب غلظتی در ۴۳۵g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، سلول‌ها از فاز میانی جدا شدند. سلول‌های

مزانشیمی در درمان آسیب‌های بافتی همچون انفارکتوس میوکارد، آسیب حاد کلیوی، بیماری‌های کبدی و سایر انواع بیماری‌ها بسیار مؤثر می‌باشد (۵-۷).

برای استفاده بالینی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نیاز به دسترسی به تعداد زیادی از سلول‌های صلاحیت‌دار از نظر عملکرد با فنوتیپ و ژنوتیپ پایدار است. طی روندهای جمع‌آوری، کشت و پردازش سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آسیب‌های متعددی به آن‌ها وارد می‌شود که بقاء و عملکردشان را در بدن کاهش می‌دهد. به عنوان مثال یک روز پس از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی به قلبی که دچار انفارکتوس شده است؛ کم‌تر از ۱ درصد سلول‌های پیوندشده، زنده باقی می‌مانند. از طرف دیگر موضع پیوند در افرادی که گیرنده سلول‌های بنیادی می‌باشند بنا به دلایل مختلفی مانند شیمی درمانی، پرتودرمانی و التهاب دارای ریز محیط سمی و شرایط استرس اُکسایشی هست که به نوبه خود می‌تواند باعث کاهش بقاء سلول‌های بنیادی متعاقب پیوند گردد (۸). اگر راه‌کاری ارایه گردد که این سلول‌ها به آسیب‌های وارده مقاوم شوند به طوری که حدود دو یا چند روز بیشتر زنده بمانند؛ می‌توان این انتظار را داشت که درصد موفقیت پیوند سلول بنیادی مزانشیمی بسیار افزایش یابد.

یکی از راه‌کارهایی که می‌توان به کار برد دست‌ورزی و مهندسی ژنتیک این سلول‌ها با استفاده از عوامل محافظت‌کننده سلولی است. یکی از این عوامل، پروتئین NF-E2 Related Factor-2 (NRF2) می‌باشد. پروتئین NRF2 یک فاکتور نسخه‌برداری محافظت‌کننده سلولی (cytoprotective) است که در برابر استرس‌های مختلف موجب بقای سلولی می‌شود. این پروتئین به طور طبیعی بیان و به پروتئین‌های سیتوپلاسمی متصل می‌شود. در اثر استرس‌های گوناگون به هسته سلول می‌رود و موجب بیان ژن‌های متعددی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، آنزیم‌های سم‌زدایی‌کننده و ژن‌های پردازش دارو می‌شود. پروتئین NRF2 و پروتئین‌های حاصل از آن،

استخراج (Ribonucleic acid) RNA و RT-PCR (Reverse transcription- polymerase chain reaction) صورت گرفت که توالی پرایمرهای مورد استفاده، شامل پرایمرهای خارجی NRF2 در جدول ۱ ارایه شده‌اند. از ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

کلونینگ ژن NRF2 درون وکتور pENTR/TEV/D-TOPO

به‌منظور کلونینگ ژن NRF2 در وکتور pENTR Directional از کیت pENTR/TEV/D-TOPO (Invitrogen Life Technologies) TOPO Cloning استفاده گردید. برای این منظور، ۲ میکرولیتر از محصول PCR مرحله قبل با ۱ میکرولیتر وکتور توپوکلونینگ میان‌کنش داده شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق واکنش تکمیل و وکتور نو ترکیب آماده ترانسفورماسیون به باکتری E.coli سوش TG1 گردید.

پس از کشت باکتری ترانسفورم شده در پلیت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک اختصاصی کانامایسین، با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation (Roch, Germany) و طبق پروتکل کیت، استخراج پلاسمید نو ترکیب صورت گرفت. از کلون‌های ایجاد شده جهت تأیید حضور ژن مورد نظر و صحت تولید وکتور نو ترکیب، PCR گذاشته شد. برای اطمینان از حضور ژن و صحت توالی ژن، تعیین توالی انجام شد. توالی‌های حاصله با نرم‌افزار بلاست مورد آنالیز قرار گرفت.

مشتق شده از مغز استخوان در محیط کشت DMEM Low glucose (STEMCELL Technologies) حاوی ۱۰ درصد FBS (STEMCELL Technologies) کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوبه ۳۷ درجه در اتمسفر مرطوب حاوی دی‌اکسید کربن ۵ درصد نگهداری شدند. با خارج کردن محیط سلول‌ها، سلول‌های غیر چسبیده خارج و محیط کشت تازه به سلول‌ها اضافه گردید. به مدت ۱۴ روز، هر ۴ روز یک‌بار محیط کشت تعویض شد. بعد از این مدت سلول‌های مزانشیمی تکثیر یافته و کف فلاسک را پوشاندند. به‌منظور تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده، پس از رشد سلول‌ها در محیط کشت اختصاصی، در سلول‌های دومین پاساژ، خصوصیات مورفولوژیکی (شکل ظاهری) و خاصیت اتصال این سلول‌ها به کف فلاسک پلاستیکی، با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی گردید.

القاء بیان ژن NRF2 با استفاده از اشعه ماورای بنفش و جداسازی آن

ژن NRF2 از جمله ژن‌های القایی هست که در شرایط طبیعی به‌میزان کم در سلول‌ها بیان می‌شود و تحت شرایط استرس سلولی، میزان بیان این ژن در سلول‌ها افزایش می‌یابد. به‌منظور جداسازی و به‌دست آوردن ژن NRF2 از رده سلولی MSC استفاده شد. برای این منظور سلول‌ها به مدت زمان ۱ ساعت تحت اشعه ماورای بنفش، انکوبه شدند. سپس

جدول ۱- پرایمر ۱" و ۲" جهت ایجاد قطعه ۱۸۲۵ جفت بازی از ژن NRF2، پرایمر ۳" و ۴" بتا اکتین جهت ایجاد قطعه ۱۱۵ جفت بازی از ژن بتا اکتین و پرایمر ۵" و ۶" جهت ایجاد قطعه ۱۸۵ جفت بازی از ژن NRF2 به‌کار رفتند.

No.	Primer name	Sequence
1	Forward NRF2 (external)	5`-CACCATGGGAATGGACTTGGAGCTGCC-3`
2	Reverse NRF2 (external)	5`-CTAGTTTTTCTTAACATCTGGCTTCTTAC-3`
3	Forward β -actin	5`-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGG-3`
4	Reverse β -actin	5`-GTGTTGAAGGTCTCAAACATGAT-3`
5	Forward NRF2 (internal)	5`-GCGACGGAAAGAGTATGAGCTGG-3`
6	Reverse NRF2 (internal)	5`-GTTGGCAGATCCACTGGTTTCTG-3`

مولد فناوری Gateway و تولید آدنووایروس‌ها

با استفاده از فناوری Gateway (Invitrogen Life Technologies) و واکنش نو ترکیبی LR که با استفاده از آنزیم LR Clonase II صورت می‌گیرد؛ ژن NRF2 از وکتور pENTR به وکتور pAD/CMV/V5-DEST منتقل گردید. تمامی اعمال صورت گرفته بر اساس پروتکل کیت و همانند روش انتقال ژن به وکتور pENTR صورت گرفت. فقط با این تفاوت که در اینجا به محیط کشت LB به میزان 100 µg/ml از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین جهت غربالگری کلون‌های باکتریایی (E.coli سوش TOP10) ترانسفورم شده افزوده شد. پس از استخراج پلاسمید، نو ترکیبی LR به وسیله آزمایش PCR با پرایمرهای داخلی ژن NRF2 که در جدول ارائه شده‌اند؛ مورد تأیید قرار گرفت.

سپس همانند قبل با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification (Roch, Germany) مراحل تخلیص، طبق پروتکل انجام گرفت. سپس وکتورهای تخلیص شده به رده سلولی A293 (Invitrogen Life Technologies) که در محیط DMEM High Glucose حاوی ۱۰ FBS درصد کشت داده شده بودند؛ با استفاده از معرف‌های ۶ FUGENE و ۶ FUGENE HD (Roch, Germany) منتقل (ترانسفکت) گردیدند. طبق دستورالعمل کیت، به‌طور طبیعی ذرات آدنووایروسی در داخل سلول‌های A293 تولید و پس از ۱۳ روز با لیز نمودن آن سلول‌ها، در محیط کشت رها شدند. در این زمان سلول‌ها را تحت مراحل انجماد و ذوب قرار دادیم تا سلول‌های لیز نشده (ولی حاوی آدنووایروس) نیز لیز شوند. سپس محیط را به مدت ۱۵ دقیقه در دور 3000rpm سانتریفوژ کردیم تا ضایعات سلولی در ته لوله فالتون جمع شوند. از آدنووایروس‌های موجود در مایع فوقانی به‌عنوان ذخیره (stock) جهت آلوده کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد.

تیتراژ کردن، تعیین MOI بهینه و آلوده کردن MSCها توسط آدنووایروس‌ها

به‌منظور تیتراژ کردن آدنووایروس‌ها از روش سنجش نقطه انتهایی رقت (end-point dilution assay) استفاده گردید (۱۶). به‌طور خلاصه، درون هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ۱×۱۰۴ سلول A293 کشت داده شد. این عمل بر روی ۳ عدد پلیت ۹۶ خانه‌ای (به‌صورت سه‌تایی) انجام گرفت. پس از ۲۴ ساعت، ابتدا با افزودن ۱۰ میکرو لیتر از ذخیره آدنووایروسی به ۹۹۰ میکرو لیتر محیط کشت، رقت 2-10 تهیه شد. سپس به‌صورت سریالی ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظت حاصله به ۹۰۰ میکرو لیتر محیط کشت اضافه گردید و بدین ترتیب رقت‌های 3-10 تا 10-10 از ویروس تهیه شدند. این عمل در حجم‌های بالاتر نیز انجام گرفت تا حجم لازم از تمامی غلظت‌ها تهیه شود. مایع رویی سلول‌های A293 برداشته و با محیط کشت‌های حاوی آدنووایروس با غلظت‌های مشخص در حجم ۱۰۰ میکرو لیتر جایگزین شدند. بدین‌صورت که به ردیف‌های A-H از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، از غلظت‌های 3-10 تا 10-10 در ستون‌های ۱-۱۰ ریخته شد. به ستون‌های ۱۱-۱۲ آدنووایروس اضافه نشد (کنترل منفی) و فقط محیط کشت ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۱۰ روز در انکوباتور قرار داده شدند. سپس تک تک چاهک‌ها توسط میکروسکوپ نوری از نظر وجود اثرات سیتوپاتیک بررسی شدند. چاهک‌های دچار آسیب را شمرده و تعداد را بر ۱۰ تقسیم کرده و به‌جای عدد x در رابطه زیر قرار دادیم:

$$\text{Titer (pfu/ml)} = 10(x + 2.8)$$

واژه MOI (multiplicity of infection) عبارت است از نسبت تعداد ذرات ویروسی به سلول که علاوه بر آن‌که قادر به آلوده‌سازی سلول هدف است منجر به سایتوتوکسیته در آن سلول نشود. برای انجام آزمایشات بعدی و بررسی بیان ژن هدف و عملکرد ژن مورد نظر در سلول‌های بنیادی، در مرحله اول لازم بود که سلول‌ها با ویروس حاوی ژن NRF2 و کنترل آلوده شوند. به‌منظور آلوده‌سازی سلول‌ها، تعیین میزان مورد نیاز از ذخیره ویروسی که منجر به مرگ سلول‌های بنیادی نشود، امری

محتوی NRF2 در روزهای مختلف، از روز صفر تا ۱۴، از تریزول استفاده گردید. سپس با استفاده از کیت cDNA synthesis (Invitrogen Life Technologies)، این سلول‌ها ساخته شد و واکنش PCR به‌منظور بررسی بیان NRF2 صورت گرفت.

ارزیابی بیان پروتئین NRF2 با استفاده از آزمون وسترن بلاتینگ

به‌منظور ارزیابی بیان NRF2 در سطح پروتئین از روش وسترن بلاتینگ استفاده گردید. ابتدا پروتئین کل سلولی با استفاده از معرف Complete Lysis M (Roch, Germany) مطابق دستورالعمل کارخانه، از داخل سلول‌ها رهاسازی شد. سپس نمونه‌ها در بافر نمونه‌گذاری محتوی ۴ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS)، ۲۰ درصد گلیسرول و بروموفنل بلو، به‌مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند. پروتئین‌ها در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲ درصد جداسازی شدند و سپس به غشای پلی وینیلیدین دی فلوراید (PVDF یا Polyvinylidene difluoride) (Roch, Germany) منتقل گردیدند و به‌صورت شبانه در معرض آنتی‌بادی‌های اولیه اختصاصی شامل آنتی‌بتا‌اکتین (Sigma, USA) و آنتی NRF2 (Santa Cruz, USA) قرار گرفتند. پس از شستشو با بافر نمکی تریس محتوی ۰/۱ درصد تووین ۲۰، غشاها با آنتی‌بادی‌های ثانویه متصل به HRP (horse raddish peroxidase) (Sigma, USA) انکوبه گردیدند. در پایان باندها با استفاده از معرف DAB (Sigma, USA) مشخص شدند.

یافته‌ها

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط مشاهدات میکروسکوپی با میکروسکوپ معکوس

پس از جداسازی سلول‌ها و کشت در محیط کشت اختصاصی، سلول‌های رشد کرده از لحاظ مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های جدا شده از لحاظ مورفولوژی مشابه

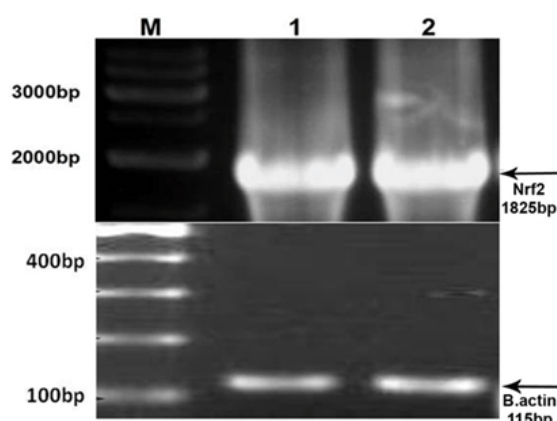
ضروری بود. برای تعیین MOI بهینه، درون هر کدام از چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای ۱×۱۰۵ سلول بنیادی مزانشیمی در حضور ۵۰۰ میکرو لیتر محیط کشت DMEM Low Glucose همراه با ۱۰ درصد FBS کشت داده شد. پس از یک روز، محیط کشت تعویض و به هر یک از چاهک‌ها، MOI های ۰، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ از ذخیره آدنوویروسی (به‌صورت سه‌تایی) اضافه و خوب مخلوط شد. به سه تا از خانه‌ها آدنوویروس اضافه نشد (کنترل منفی). دو روز بعد از آلوده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ذخیره آدنوویروسی نو ترکیب حاوی ژن NRF2، میزان مرگ سلولی با سنجش MTT ارزیابی شد. جهت انجام سنجش MTT، پس از خارج نمودن محیط کشت سلول‌ها، آن‌ها را به‌مدت ۴ ساعت با معرف MTT (Dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) انکوبه نمودیم. سپس بافر سورنسن و DMSO به چاهک‌ها اضافه گردید و در طول موج ۵۷۰ نانومتر، OD آن‌ها قرائت شد.

بررسی تاثیر آلوده کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آدنوویروس‌ها بر بیان NRF2

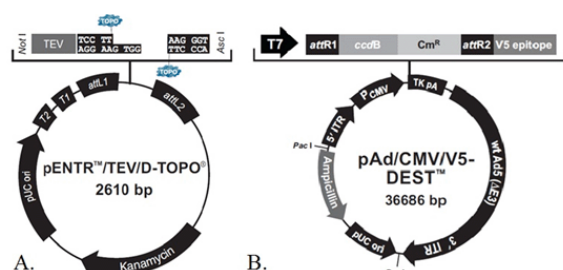
به‌منظور بررسی تاثیر آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2 و کنترل بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ابتدا سلول‌ها را با آدنوویروس‌ها آلوده نمودیم. سپس از سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده و همچنین کنترل (سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون آلودگی با آدنوویروس‌ها) استخراج RNA و ساخت cDNA به عمل آمد. در مرحله بعد با استفاده از پرایمرهای داخلی NRF2 و نیز پرایمرهای بتا اکتین، RT-PCR صورت گرفت.

بررسی بیان موقت NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2

به‌منظور بررسی بیان موقت NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده‌شده با آدنوویروس، از واکنش RT-PCR استفاده شد. جهت استخراج RNA سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس‌های نو ترکیب



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی NRF2. تصویر بالا) نتایج RT-PCR ژن NRF2: چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرو لیتتر)، چاهک ۱ و ۲ (باند ۱۸۲۵ ژن NRF2) مربوط به رده سلولی MSC تیمار شده با اشعه ماورای بنفش می‌باشد. تصویر پایین) نتایج RT-PCR ژن بتا اکتین: چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرو لیتتر) می‌باشد. نتایج نشان داد که تغییری در میزان بیان این ژن در بین نمونه‌ها وجود نداشت.



شکل ۲- A) نمایش شماتیک وکتور خالی pENTR/TEV/D-TOPO همان‌طوری که مشاهده می‌شود آنزیم توپوایزومراز به وکتور متصل است. **B)** نمای شماتیک وکتور pAd/CMV/V5-DEST وکتور بیانی با اندازه 36686bp دارای دو ناحیه attR1 و attR2 می‌باشد که جایگاه‌های لازم برای واکنش LR با وکتور pENTR- (Entry vector) NRF2 است. جایگاه CmR، توالی ژن مقاومت به کلرامفنیکل است که پس از انجام واکنش نو ترکیبی حذف می‌شود (۱۷).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بودند. علاوه بر این خاصیت، اتصال به کف فلاسک پلاستیکی و نیز توانایی رشد در محیط کشت انتخابی DMEM-LG، نشان دادند که سلول‌های جدا شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بودند.

جداسازی RNA کل از MSC‌های تیمار شده با اشعه ماورای بنفش و انجام RT-PCR به منظور جداسازی ژن NRF2

به منظور دستیابی به ژن NRF2 در ابتدا لازم بود که RNA سلول‌ها بعد از تیمار با اشعه استخراج شود. برای جداسازی ژن NRF2 لازم بود ابتدا cDNA کل سلولی سنتز و سپس cDNA ژن مورد نظر از مجموعه جدا گردد، برای این منظور از تکنیک RT-PCR برای سنتز cDNA کل سلول استفاده شد. با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژن و پرایمرهای طراحی شده، انتظار می‌رفت ژن NRF2 پس از القاء سلول‌ها با اشعه ماورای بنفش، طی واکنش‌های PCR جدا شود. در طراحی پرایمرها سعی شد تا علاوه بر اختصاصی بودن برای ژن، دارای چهار نوکلئوتید ویژه واکنش توپوکلونینگ نیز باشند. پس از اتمام فرآیند، محصول PCR با الکتروفورز آنالیز گردید، نتیجه ایجاد باند ۱۸۲۵ بازی بود که با طول قطعه ژن موجود در بانک ژنی مطابقت داشت (شکل ۱). در تمام نمونه‌های تیمار شده با اشعه ماورای بنفش این باندها مشاهده شد.

کلونینگ ژن NRF2 درون وکتور pENTR/TEV/D-TOPO

محصول PCR برای واکنش توپوکلونینگ مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام واکنش وکتور نو ترکیب به باکتری مستعد به روش شیمیایی انتقال داده شد. از آنجا که ناقل کلونینگ حاوی ژن مقاومت به کانامایسین بود باکتری‌های نو ترکیب به منظور غربالگری در محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند (شکل ۲).

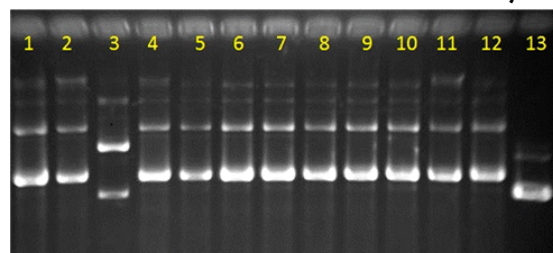
فناوری Gateway و تولید آدنوویروس‌ها

در مرحله قبل ناقل entry برای واکنش نوترکیبی LR تهیه گردید و ژن NRF2 در وکتور موردنظر کلون گردید. در این مرحله، طی فناوری Gateway، وکتور حاوی ژن NRF2 (Entry Vector) با وکتور ویروسی واکنش نوترکیبی (LR recombination) انجام داده و وکتور ویروسی نوترکیب تهیه گردید.

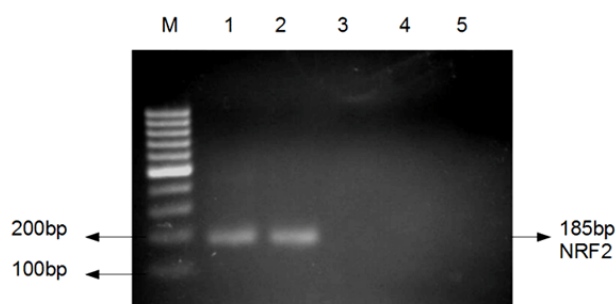
پس از انجام واکنش LR و از دست رفتن ژن مقاومت به کلرامفنیکل و تأیید کلون‌های حاوی وکتور بیانی نوترکیب pAD/CMV/V5-NRF2 با کشت در حضور آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی، به‌منظور تأیید کلون‌ها، پلاسمید استخراج گردید و از کلون‌های رشد کرده در محیط کشت اختصاصی آنالیز PCR به‌عمل آمد. برای این منظور از ۴ کلونی مورد بررسی با پرایمرهای داخلی NRF2، PCR انجام شد. پس از الکتروفورز محصولات آن‌ها، ۲ کلون شماره ۲ و ۱ دارای باند ۱۸۵ جفت بازی بودند که نشان‌دهنده حضور ژن NRF2 در کلونی‌ها بود و در کلون‌های ۳ و ۴ واکنش LR صحیح انجام نشده بود. چاهک ۵ به‌عنوان کنترل منفی بود (شکل ۵). یکی از

از کلونی‌های رشد کرده در محیط کشت اختصاصی، استخراج پلاسمید به‌عمل آمد که از ۱۳ کلونی مورد بررسی، پس از الکتروفورز آن‌ها، ۱۱ کلونی سنگین‌تر بودند که می‌توانست نشان‌دهنده حضور ژن NRF2 در کلونی‌ها باشد و ۲ کلون دیگر حاوی وکتور خالی بودند (شکل ۳). یکی از کلونی‌ها (شماره ۱) که شامل ژن NRF2 کلون‌شده در وکتور pENTR می‌باشد، برای مراحل بعدی آنالیز مورد استفاده قرار گرفت.

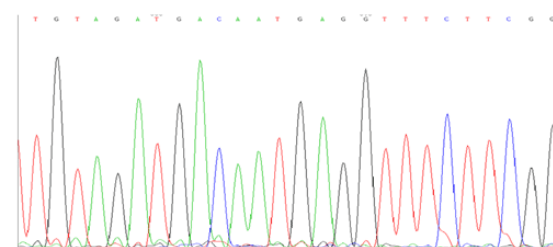
برای تأیید نهایی، ناقل توپوکلونینگ تعیین توالی شد که نتیجه آن حضور ژن در پلاسمید و قرار گرفتن آن در قالب صحیح را اثبات کرد (شکل ۴). توالی حاصله به‌منظور ثبت به بانک ژن فرستاده شد که پس از بررسی و آنالیز از طرف آنان مورد پذیرش قرار گرفت و با کد HM446346، به‌نام مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ثبت شد.



شکل ۳- الکتروفورز پلاسمیدها بر روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک ۱، ۲ و ۳ از کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب رشد کرده در محیط اختصاصی کانامایسن و ۲ کلونی ۳ و ۱۳ سبک‌تر بوده که نشان‌دهنده عدم حضور ژن NRF2 در کلونی‌ها بود.

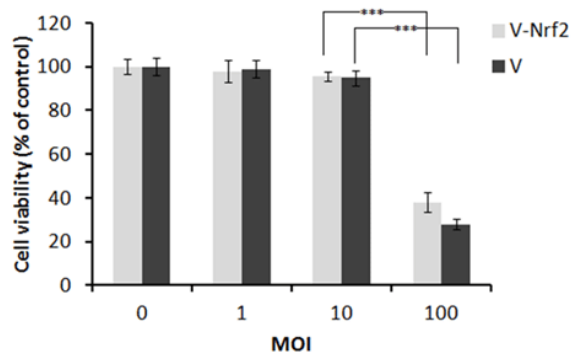


شکل ۵- الکتروفورز محصول PCR کلون‌های pAD/CMV/V5 نوترکیب حاوی ژن NRF2 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۴-۱ محصول PCR از کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب رشد کرده در محیط اختصاصی آمپی‌سیلین. ۲ کلونی دارای باند ۱۸۵ جفت بازی بوده که نشان‌دهنده حضور ژن NRF2 در کلونی‌ها بود. چاهک ۵ به‌عنوان کنترل منفی PCR در نظر گرفته شده بود.

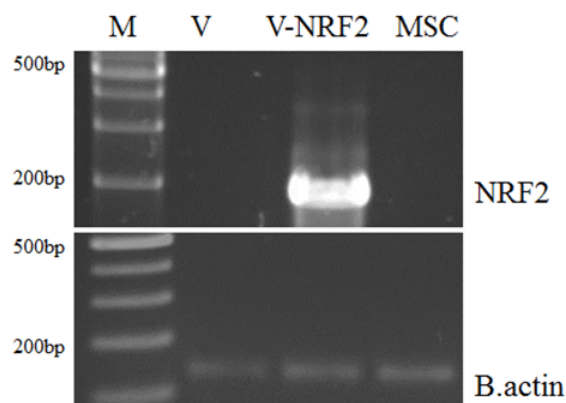


شکل ۴- نتیجه تعیین توالی قسمتی از توالی ژن NRF2 در پلاسمید حاصل از کلون شماره ۱ نشان داده شده است. با مقایسه توالی به‌دست آمده با توالی ژن NRF2 موجود در ژن بانک، جداسازی ژن NRF2 را تأیید کرد.

آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2 موجب افزایش بیان ژن NRF2 در MSC‌ها شد. در حالی که در MSC‌های کنترل و نیز آلوده‌شده با آدنوویروس‌های خالی، بیانی از ژن NRF2 مشاهده نگردید. بیان ژن بتا‌اکتین در بین تمامی نمونه‌ها مشاهده شد.



نمودار ۱- آلوده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با غلظت‌های متفاوت ویروسی. در MOI‌های ۱۰-۰ میزان زنده بودن سلول‌های آلوده‌شده با آدنوویروس محتوی NRF2 و خالی (کنترل) بیش از ۹۰ درصد بود و در MOI ۱۰۰ سایتوتوکسیتی سلول‌ها مشاهده شد.



شکل ۶- بیان NRF2 در MSC‌ها به دنبال آلودگی با آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2 و خالی (کنترل). تصویر بالا: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن NRF2 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. چاهک ۱ (M) شاخص ۱۰۰ جفت بازی (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرو لیتر). چاهک ۲ (V) مربوط به MSC‌های آلوده‌شده با آدنوویروس‌های خالی، چاهک ۳ (V-NRF2) مربوط به MSC‌های آلوده‌شده با آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2 و چاهک ۴ (MSC) مربوط به MSC‌های کنترل (آلوده‌نشده با آدنوویروس‌ها)

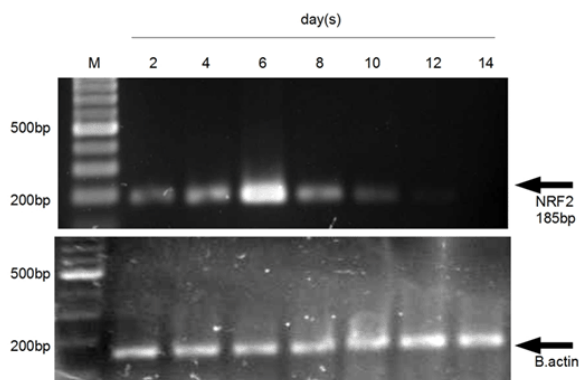
کلونی‌ها (شماره ۱) برای مراحل بعدی آنالیز مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین تیتراژ آدنوویروس و دوز MOI بهینه

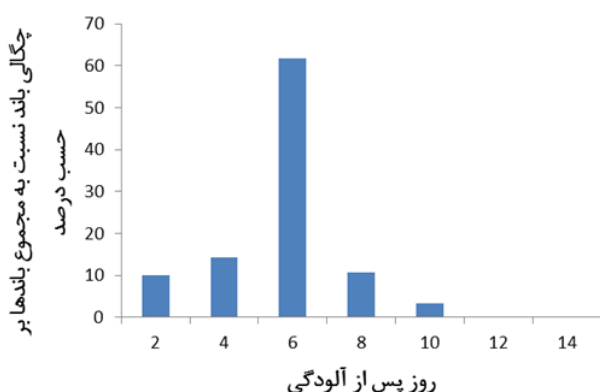
پس از تهیه ذخیره نهایی آدنوویروس‌ها، جهت دستیابی به نتایج یکسان در آزمایشات متعدد لازم بود که تیتراژ آدنوویروس در هر آزمایش یکسان باشد. برای این منظور در مرحله اول تیتراژ آدنوویروس با استفاده از روش سنجش نقطه انتهای رقت به‌دست آمد. این تست به‌صورت سه‌تایی انجام گرفت و بر اساس نتایج حاصله، تیتراژ آدنوویروس محتوی NRF2 در ذخیره نهایی در حدود 5×10^7 واحد تشکیل‌دهنده پلاک در هر میلی‌لیتر و تیتراژ آدنوویروس خالی (کنترل) در ذخیره نهایی آن در حدود 3.7×10^7 واحد تشکیل‌دهنده پلاک در هر میلی‌لیتر بود.

به‌منظور استفاده از ویروس برای آلوده‌سازی سلول‌ها و بیان ژن NRF2 در سلول‌های آلوده‌شده با ویروس، تعیین میزان غلظتی از ویروس که هم باعث سایتوتوکسیتی بر روی سلول‌ها نشود و هم منجر به بیان ژن NRF2 گردد، ضروری بود. برای این منظور لازم بود که بیشترین دوزی از آدنوویروس که سلول‌ها را نکشد تعیین شود. بدین‌منظور پیش از آلوده کردن (Infection) سلول‌ها برای آزمایشات نهایی، غلظت‌های مختلف از ذخیره‌های ویروسی (MOI‌های مختلف) بر روی سلول‌های MSC اضافه شدند و سپس با استفاده از سنجش MTT نتایج بررسی گردیدند. در این آزمایش MOI ۱۰۰ منجر به مرگ سلول گردید (نمودار ۱). بدین‌ترتیب MOI ۱۰ جهت انجام آزمایشات انتخاب شد. بررسی بیان ژن NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دنبال آلودگی با آدنوویروس‌ها

مقایسه بیان ژن NRF2 بین سه نوع نمونه MSC‌های آلوده‌شده با آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2 و آدنوویروس‌های خالی و نیز MSC‌های آلوده‌نشده با آدنوویروس‌ها (کنترل)، نشان داد که آلودگی با



شکل ۷- بررسی بیان موقت NRF2 سلول‌های بنیادی مزانشیمی
آلوده‌شده با آدنوویروس محتوی ژن NRF2 با آزمایش RT-PCR. تصویر بالا: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن NRF2 بر روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک ۱ (M) شاخص ۱۰۰ جفت بازی (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، سایر چاهک‌ها به ترتیب مربوط به نمونه استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ روز از زمان آلوده شدن آن‌ها با آدنوویروس بودند. تصویر پایین: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن بتا اکتین نمونه‌های فوق بر روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک ۱ (M) شاخص ۱۰۰ جفت بازی (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر).



نمودار ۲- تعیین بیان NRF2 در روزهای مختلف به دنبال آلودگی
با آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2. جهت نیمه‌کمی نمودن یافته‌های مربوط به بیان NRF2 در روزهای مختلف که در شکل ۷ ارائه شده‌اند؛ چگالی باندهای RT-PCR با استفاده از نرم‌افزار imageJ اندازه‌گیری و نسبت به بتا اکتین نرمالیزه شدند.

می‌باشند. همان‌گونه که دیده می‌شود تنها در چاهک ۳ (V-NRF2) بیان قابل توجه ژن NRF2 مشاهده گردید که نشان داد آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2 موجب افزایش بیان NRF2 می‌شوند. تصویر پایین: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن بتا اکتین بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. چاهک ۱ (M) شاخص ۱۰۰ جفت بازی (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر).

بررسی بیان موقت ژن NRF2 نو ترکیب با استفاده از RT-PCR

از نمونه‌های MSC آلوده‌شده با آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2 در روزهای مختلف، RNA استخراج و cDNA ساخته شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی NRF2 انسانی، PCR انجام گرفت. پرایمر طراحی شده برای ژن NRF2 توانایی سنتز قطعه‌ای به طول ۱۸۵ جفت بازی را داشت. بر اساس نتایج آزمایش RT-PCR، بیشترین بیان NRF2 مربوط به روز ششم بود. همچنین نتیجه آزمایش نشان داد که ۱۴ روز پس از آلوده شدن MSCها با آدنوویروس‌ها، بیانی از NRF2 مشاهده نگردید.

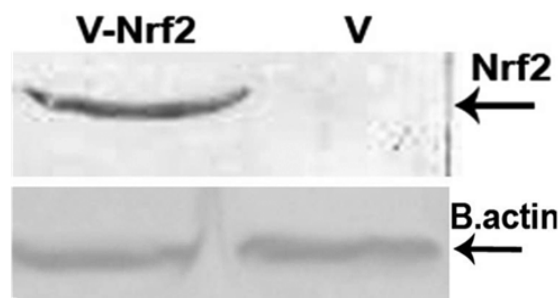
به منظور تعیین نیمه‌کمی میزان بیان از نرم‌افزار imageJ ویرایش ۱/۴۶ (National Institutes of Health، مریلند، بتسدا) استفاده گردید. سپس میزان بیان ژن NRF2 نسبت به بتا اکتین نرمالیزه شد. نتیجه این آزمایش نشان داد که در حدود ۶۰ درصد از کل بیان ژن NRF2 در حدود روز ششم صورت گرفته است و این یافته با شکل ۷ مطابقت دارد.

تعیین بیان پروتئین NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دنبال آلودگی با آدنوویروس‌ها
با استفاده از روش وسترن بلائینگ نیز بیشترین بیان پروتئین NRF2 در روز ششم تشخیص داده شد. تمامی تلاش‌ها جهت نشان دادن بیان پروتئین NRF2 در سایر روزها، نتیجه‌ای در پی نداشت. این امر نیز نشان‌دهنده بیان موقت NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد.

سلول‌های پیوندی می‌دانند و برای افزایش کارایی و موفقیت پیوند، افزایش بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌وسیله عوامل محافظت‌کننده سلولی را ضروری معرفی می‌کنند. آنان همچنین عنوان می‌کنند که یکی از راه کارهای مؤثر و قوی، دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با عوامل محافظت‌کننده سلولی می‌باشد (۱۸). همچنین Song و همکاران یافتند که دست‌ورزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با فاکتور رشد فیروبلاست-۲ (FGF-2) بقای آن‌ها را تحت شرایط هیپوکسیک ۳ برابر نموده و همچنین میزان آپوپتوز را کاهش داده است (۱۹). نتایج تقریباً مشابهی از طریق دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ژن‌های HO-1, Bcl-2, Hsp20, VEGF, EC-SOD و SDF-1 به‌دست آمده است (۲۰-۲۶).

فاکتور نسخه‌برداری NRF2 یک فاکتور نسخه‌برداری bZIP (basic leucine zipper) می‌باشد که از مدت‌ها پیش به‌عنوان یک فاکتور حیاتی در حفاظت سلول علیه آسیب‌های اکسیداتیو و الکتروفیل شناخته شده است. تحت شرایط بدون استرس، NRF2 در سیتوپلاسم به‌صورت متصل به پروتئین keap1 می‌باشد و پس از نیمه عمر چندساعته، یوبیکویتینه و تجزیه می‌گردد. تحت شرایط استرسی، NRF2 از keap1 جدا می‌شود و نیمه عمر آن افزایش می‌یابد. سپس به هسته منتقل می‌گردد که سبب رونویسی از ژن‌هایی می‌شود که موجب افزایش مقاومت سلولی در برابر استرس‌های مختلف می‌گردد (۲۷-۳۰).

بر اساس این‌که NRF2 در *in vitro* و *in vivo* به‌دنبال انواع استرس‌های سلولی، عملکردهای قوی آنتی‌اکسیدانی و آنتی آپوپتوتیک دارد و نیز از آن‌جایی که در طی مراحل جداسازی، پردازش و کشت سلولی در *in vitro* و نیز پس از پیوند به بدن گیرنده به سلول‌های بنیادی مزانشیمی آسیب‌های زیادی وارد می‌شود، در این مطالعه ما ویژگی‌های محافظت سلولی NRF2 را به‌منظور افزایش مقاومت و بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی قبل از پیوند و



شکل ۸- بیان پروتئین NRF2 در MSC‌های آلوده‌شده با آدنوویروس‌ها با استفاده از آزمون وسترن بلاتینگ. تصویر بالا: چاهک ۱ (V-NRF2) مربوط به MSC‌های آلوده‌شده با آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2 و چاهک ۲ (V) مربوط به MSC‌های آلوده شده با آدنوویروس‌های کنترل می‌باشند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود آلودگی با آدنوویروس‌های محتوی ژن NRF2 موجب افزایش بیان آن ژن گردید. تصویر پایین: پروتئین بتا‌اکتین در هر دو نمونه بیان شده است.

بحث

امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مهم‌ترین سلول‌های مورد استفاده در سلول درمانی هستند. استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای درمان سلولی، بر پایه ظرفیت این سلول‌ها در پیوند به بافت‌های آسیب‌دیده و تعمیر این بافت‌ها می‌باشد. با وجود فواید متعدد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در زمینه پیوند، میزان بقاء سلولی پایین سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روزهای ابتدایی پس از پیوند به بافت‌های آسیب‌دیده، موجب می‌شود بازدهی پیوند بسیار پایین‌تر از حد انتظار باشد و بهبود عملکردی پایینی را موجب شود (۱۸). بنابراین برای افزایش بازدهی پیوند و درمان مؤثر نیاز است سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به عوامل محافظت‌کننده سلولی مجهز کنیم تا در برابر شرایط آسیب‌رسان ریز محیط پیوندی مقاومت کرده و زنده بمانند.

در این رابطه Haider و همکارش مهم‌ترین عامل عدم موفقیت پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بقاء پایین

کارایی می‌شود و سیستم را برای استفاده در کاربردهای با ظرفیت بالا بسیار توانمند می‌سازد.

جهت استفاده از فناوری Gateway، چهار نوکلئوتید CACC به ابتدای پرایمر مستقیم خارجی افزوده شد، بدین ترتیب این توالی در ابتدای توالی ژن NRF2 قرار گرفت. این توالی خاص، موجب وارد شدن ژن NRF2 به وکتور pENTR/TEV/D-TOPO می‌شود که این عمل با استفاده از آنزیم توپوایزومراز که به همراه وکتور مذکور وجود دارد، صورت می‌گیرد. استفاده از این آنزیم و وجود این توالی خاص، موجب کلون شدن سریع، در جهت مناسب و با کارایی بالای ژن می‌شود. وکتور pENTR/TEV/D-TOPO دارای جایگاه‌های نوترکیبی attL هست که جهت استفاده از فناوری Gateway مورد نیاز می‌باشند. با استفاده از فناوری Gateway، ژن NRF2 از وکتور pENTR/TEV/D-TOPO به وکتور آدنوویروسی pAD/CMV/V5 منتقل گردید. این عمل توسط نوترکیبی بین جایگاه‌های att با استفاده از آنزیم کلوناز صورت می‌گیرد. در مرحله بعد با انتقال (ترانسفکت) این وکتورهای ویروسی به سلول‌های A293، ذرات آدنوویروسی تشکیل شدند.

در پایان از آدنوویروس‌های تشکیل‌شده، به‌منظور افزایش بیان موقت NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد. مطالعات نشان می‌دهد آلوده شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با وکتورهای آدنوویروسی و یا رتروویروسی، بدون تغییر در فنوتیپ، میزان زنده بودن، سرعت تکثیر و ظرفیت تمایز موجب بیان پروتئین موردنظر خواهد شد (۱۴). در مقایسه با وکتورهای ویروسی دیگر مانند لنتی ویروس، رتروویروس و ویروس مرتبط با آدنو (AAV یا Adeno-associated virus)، سیستم بیانی آدنوویروسی ویژگی‌های مفید متعددی دارد که می‌توان به مواردی از قبیل بیان موقت و بالای ژن، انتقال کارا و مؤثر ژن در شرایط in vitro و in vivo، آلوده‌سازی آسان، تطبیق‌پذیری بالا با قطعات DNA خارجی، الحاق نیافتن به ژنوم میزبان و تولید ذخیره‌های

نیز افزایش کارایی و بهبود عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از پیوند به کار بردیم.

از معایب دست‌ورزی ژنتیکی دایمی به‌وسیله وکتورهای ویروسی، امکان جهش‌زایی و ایجاد تومور به‌واسطه الحاق ژنوم ویروس به ژنوم میزبان می‌باشد. همچنین بیان دایمی ژن هدف مانند NRF2 ممکن است عوارض جانبی نامطلوبی را در پی داشته باشد؛ با این وجود در درمان کوتاه‌مدت (درمان بیماری در یک مدت زمان محدود) ایمنی بالاتری تصور می‌شود. از طرف دیگر یکی از معایب احتمالی افزایش بیان دایم NRF2، خطر ایجاد تومور می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد پروتئین Keap1 که سرکوب‌کننده NRF2 است اغلب در سلول‌های سرطانی موتاسیون یافته است و این موضوع موجب فعال شدن NRF2 می‌گردد. از طرف دیگر نشان داده شده است که محیط هیپوکسیک تومور موجب افزایش فعال شدن NRF2 می‌شود. با در نظر گرفتن این نکته که NRF2 مجموعه ژن‌هایی را که در سم‌زدایی داروهای سرطانی و در تضعیف استرس‌های اکسیداتیو ناشی از داروها نقش دارند تنظیم می‌کند؛ این احتمال مطرح است که افزایش بیان NRF2 ممکن است در افزایش مقاومت به درمان نقش داشته باشد. در نتیجه بیان موقت ژن به واسطه وکتور آدنوویروسی یک مزیت به‌شمار می‌رود، به‌طوری‌که امروزه وکتور آدنوویروسی یکی از متداول‌ترین وکتورهای ویروسی در تحقیقات به‌شمار می‌رود.

در این مطالعه اولین بار افزایش بیان موقت ژن NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داده شد. این افزایش با استفاده از سیستم بیانی آدنوویروسی بر پایه فناوری Gateway صورت گرفت. انتقال کارا و مؤثر ژن به‌وسیله وکتورهای آدنوویروسی در پیوستگی با بهره‌مندی از فناوری Gateway می‌تواند از برتری‌های مطالعه ما از دیگر تحقیقات باشد، به‌طوری‌که فناوری Gateway از طریق مکانیسم نوترکیبی همولوگ موجب ایجاد ساختارهای آدنوویروسی با درجه بالایی از دقت و

نتیجه‌گیری

با توجه به این موضوع که اکثریت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روزهای ابتدایی پس از پیوند دچار مرگ سلولی می‌شوند و همان‌طوری که در این مطالعه نشان داده شد بیان ژن توسط سیستم بیانی آدنوویروسی، موقت می‌باشد؛ بنابراین استفاده از این سیستم بیانی در مسلح نمودن سلول‌های بنیادی مزانشیمی در برابر استرس‌های مختلف، منطقی خواهد بود. همچنین استفاده از فناوری‌های توپوکلونینگ و Gateway در مقایسه با روش‌های سنتی کلون کردن، به آسانی و با اطمینان بالا، ژن مورد نظر را به وکتورهای هم‌چون وکتور آدنوویروسی منتقل می‌نماید.

همان‌طوری که گفته شد، NRF2 یک فاکتور نسخه‌برداری محافظت‌کننده سلولی است که در صورت مواجهه سلول‌ها با شرایط استرسی موجب بیان ژن‌هایی می‌گردد که باعث محافظت سلول‌ها می‌شوند. از جمله موارد مواجهه سلول‌ها با شرایط استرسی می‌توان به فرایند سلول درمانی و پیوند سلول‌ها، مسمومیت با مواد شیمیایی و آکسنده‌ها و همچنین شیمی درمانی سرطان‌ها اشاره نمود. بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که از آدنوویروس‌های طراحی‌شده در این مطالعه بتوان جهت توانمند نمودن سلول‌ها در شرایط فوق بهره برد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفته است. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از دست‌اندرکاران محترم سازمان انتقال خون ایران تشکر و قدردانی می‌نمایند.

آدنوویروسی با تیترا بسیار بالا و در زمان کم اشاره کرد (۳۱ و ۳۲). در این مطالعه مشخص گردید که افزایش بیان موقت ژن NRF2 از روز دوم آلودگی با آدنوویروس‌ها آغاز شد و در روز ششم به حداکثر میزان خود رسید و پس از آن کاهش یافت، به‌طوری‌که چهارده روز پس از آلودگی با آدنوویروس‌ها، بیان قابل ملاحظه‌ای از ژن NRF2 مشاهده نگردید.

مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که وکتورهای آدنوویروسی پس از ورود به سلول به صورت اپی‌زومال باقی می‌مانند و به ژنوم میزبان الحاق پیدا نمی‌کنند. این امر موجب می‌شود که بیان ژن توسط وکتورهای آدنوویروسی، موقت باشد (۳۳ و ۳۴). عبدالمجید و همکارانش جهت بیان موقت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز خارج سلولی و وانگ و همکارانش جهت بیان موقت پروتئین شوک حرارتی ۲۰ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هر دو از وکتور آدنوویروسی استفاده کردند (۲۲ و ۲۳). در هر دوی این مطالعات ثابت گردید که افزایش بیان این ژن‌ها توسط آدنوویروس‌ها، کاملاً موقت می‌باشد. از طرف دیگر مهم‌ترین مزیت استفاده از وکتورهای آدنوویروسی در سلول درمانی، همین موقتی بودن بیان آن‌هاست. همچنین نتایج آزمایش‌های ما نیز نشان دادند که افزایش بیان NRF2 توسط وکتورهای آدنوویروسی، موقت بود. همان‌گونه که گفته شد افزایش بیان دائمی NRF2 می‌تواند عوارض نامطلوب و سرطانی برای سلول به همراه داشته باشد که در کلیه آزمایش‌های انجام‌گرفته در طی این مطالعه، اثری از این نوع تغییرات مشاهده نگردید.

References

1. Liu X, Hou J, Shi L, Chen J, Sang J, Hu S, et al. Lysophosphatidic acid protects mesenchymal stem cells against ischemia-induced apoptosis in vivo. *Stem Cells*. 2008;26(1):135-45.
2. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105:93-8.
3. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103:697-705.

4. Pereira RF, Halford KW, Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92(11):4857-61.
5. Zhang W, Su X, Gao Y, Sun B, Yu Y, Wang X, et al. Berberine protects mesenchymal stem cells against hypoxia-induced apoptosis in vitro. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(8):1335-42.
6. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004;109(12):1543-9.
7. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res*. 2005;66(3):543-51.
8. Wang JA, Chen TL, Jiang J, Shi H, Gui C, Luo RH, et al. Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29(1):74-82.
9. Yates MS, Tran QT, Dolan PM, Osburn WO, Shin S, McCulloch CC, et al. Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: Overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1.knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis*. 2009;30:1024-31.
10. Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem*. 2003;278(14):12029-38.
11. Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, et al. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFκB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2008;76:1485-9.
12. Reisman SA, Yeager RL, Yamamoto M, Klaassen CD. Increased Nrf2 activation in livers from keap1-knockdown mice Increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. *Toxicol Sci*. 2009;108:35-47.
13. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway: Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem*. 2003;278:8135-45.
14. Roelants V, eacute, ronique, Labar D, de Meester C, Havaux X, et al. Comparison between adenoviral and retroviral vectors for the transduction of the thymidine kinase PET reporter gene in rat mesenchymal stem cells. *J Nucl Med*. 2008;49(11):1836-44.
15. Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Ann Rev Biochem*. 1989;58:913-49.
16. Weng Q, Yang K, Xiao W, Yuan M, Zhang W, Pang Y. Establishment of an insect cell clone that harbours a partial baculoviral genome and is resistant to homologous virus infection. *J Gen Virol*. 2009;90:2871-6.
17. Invitrogen Life Technologies. pENTR Directional TOPO Cloning Kits and pAd/CMV/V5-DEST™ and pAd/PL-DEST [cited Mar 31 2013]. Available at: URL: www.invitrogen.com
18. Haider HK, Ashraf, M. Strategies to promote donor cell survival: Combining preconditioning approach with stem cell transplantation. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:554-66.
19. Song H, Kwon K, Lim S, Kang SM, Ko YG, Xu Z, et al. Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions. *Mol Cells*. 2005;19(3):402.
20. Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, et al.: Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells*. 2007;8:2118-27.
21. Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:416-25.
22. Abdel-Mageed AS, Senagore AJ, Pietryga DW, Connors RH, Giambernardi TA, Hay RV, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells genetically modified with extracellular superoxide dismutase improves survival in irradiated mice. *Blood*. 2009;113:1201-3.
23. Wang X, Zhao T, Huang W, Wang T, Qian J, Xu M, et al. Hsp20-engineered mesenchymal stem cells are resistant to oxidative stress via enhanced activation of akt and increased secretion of growth factors. *Stem Cells*. 2009; 27:3021-31.
24. Shu T, Zeng B, Ren X, Li Y. HO-1 modified mesenchymal stem cells modulate MMPs/TIMPs system and adverse remodeling in infarcted myocardium. *Tissue Cell*. 2010;42:217-22.
25. Jazwa A, Loboda A, Golda S, Cisowski J, Szelag M, Zagorska A, et al. Effect of heme and heme oxygenase-1 on vascular endothelial growth factor synthesis and angiogenic potency of human keratinocytes. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:1250-63.
26. Deshane J, Chen S, Caballero S, Grochot-Przeczek A, Was H, Li Calzi S, et al. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007;204:605-18.
27. Jin W, Wang H, Ji Y, Zhu L, Yan W, Qiao L, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to acute lung injury after traumatic brain injury in mice. *Exp Biol Med*. 2009;234(2):181-9.

28. Lee J-M, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol.* 2004;37(2):139-43.
29. Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, Nilles T, Biswal S, Trush MA, et al. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Arch Biochem Biophys.* 2006;454(1):7-15.
30. Homma S, Ishii Y, Morishima Y, Yamadori T, Matsuno Y, Haraguchi N, et al. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(10):3423-32.
31. Conget PA, Minguell JJ. Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Exp Hematol.* 2000;28:382-90.
32. Deglurkar I, Mal N, Mills WR, Popovic ZB, McCarthy P, Blackstone EH, et al. Mechanical and electrical effects of cell-based gene therapy for ischemic cardiomyopathy are independent. *Hum Gene Ther.* 2006;17:1144-51.
33. Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* 2005;12 Suppl 1:S18-27.
34. Ehrhardt A, Xu H, Kay MA. Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle in vivo. *J Virol.* 2003;77(13):7689-95.